



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : ...../2022

---

Présenté et soutenu par :  
**Fatima Zohra Righi**  
**Zineb Mghezzi Chaa**  
Le : mercredi 22 juin 2022

## Thème

### Les microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase

---

#### Jury :

Titre	Nasser BOULOCIF	MAA	Université de Biskra	Président
Titre	Hakim HEBAL	MCA	Université de Biskra	Rapporteur
Titre	Sara BOULMAIZ	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021-2022

# Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier Allah notre Dieu, pour nous avoir donné la force, le courage, la volonté et surtout de nous avoir accordé une grande patience pour achever notre travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements envers notre encadreur Dr. **Hakim Hebal**, maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie -Biskra, pour sa disponibilité, son encadrement, sa confiance surtout.

Nous remercions les honorables membres du jury Pour l'intérêt porté à ce travail et d'avoir accepté de l'examiner, et pour vos efforts pour l'améliorer.

Mille merci à monsieur le Dr. **Hadjeb Ayoub**, maître de conférence en agronomie à la faculté de sciences de nature et de vie-Biskra pour ses conseils et ses orientations avisés avec beaucoup d'intérêt

Tous les mots de merci à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

# Dédicace

Toutes les lettres ne sauront trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance. Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce travail à :

Ma mère « **Saouti Khedidja** », Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir . Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme mère . Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

Mon père « **Amara** », J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur avec nous.

Mes chers frères ; le précieux et le sage « **Salah Eddine Righi** » , le héros et le généreux « **Ilyes Righi** » , et enfin mon bras droit « **Ahmed Righi** » ta bonté, ton précieux soutien, ton encouragement tout au long de mes derniers années d'étude, ton amour et ton affection, ont été pour moi l'exemple de persévérance .

Ma sœur « **Israa** » ; la plus douce Je te souhaite beaucoup de succès, de prospérité et une vie pleine de joie et de bonheur.

Toute ma famille , mes oncles , mes tantes et précisément ma grande mère « **Messaouda** » et mon cousin « **Khalil Saouti** » merci pour tout et que Dieu vous donne bonne santé et longue vie .

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail mon père **Abdelhak**, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

A ma très chère mère **Dalila**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma considération pour vos sacrifices innombrables qui m'a encouragé. Merci énormément pour ton cher tendresse, pour vos prières et vos soutien. Puisse

Dieu, tout puissant vous combler de santé de bonheur et vous procurer une longue vie.

A mon oncle **Abdelouahed** et sa femme **Zara**.

Merci énormément pour vos amours et vos tendresses. je prie Dieu Tout-Puissant vous combler de santé et longie vie.

A mes chers frères **Mohamed Ridha** et **Khaled**

Et mes belles sœurs **Dounia Ouarda** et **Hanane**

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

Ma chère amie **Leila Goudjil**

Pour son soutient moral, qui a toujours été a cote de moi je lui souhaite une vie heureuse.

Un grande merci a mon amie **Widad Hadji** être avec moi.

A tous ceux qui porte

## Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

### Première partie: Synthèse bibliographique

#### Chapitre 01 : Généralités sur la cellulose et les cellulases

1.1. La biomasse ligno-cellulosique.....	2
1.1.1. Définition.....	2
1.1.2. Sources et compositions.....	3
1.2. La cellulose.....	4
1.2.1. Définition.....	4
1.2.2. Structure.....	5
1.3. Les hémicelluloses.....	5
1.4. La lignine et les extractibles.....	6
1.5. Les cellulases.....	6
1.5.1. Définition.....	6
1.5.2. Nomenclature des cellulases.....	6
1.5.3. Quelques caractéristiques.....	7
1.5.3.1. Réaction et spécificité.....	7
1.5.3.2. Les inhibiteurs.....	7
1.5.3.3. Activité enzymatique.....	7
1.5.3.4. Poids moléculaire.....	7
1.5.3.5. Température optimale.....	7
1.5.4. Mécanisme de cellulase.....	7
1.6. Les Microorganismes cellulolytique.....	8
1.7. Applications des cellulases.....	10

#### Chapitre 02 : Microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase

2.1.L'extremophilie.....	12
2.1.1. Les microorganismes thermophiles.....	12

2.1.1.1. Phylogénie des procaryotes thermophiles .....	13
2.1.2. Les hyperthermophiles .....	13
2.1.2.1. Biotopes des hyperthermophiles .....	14
2.1.3. Microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase.....	14

## **Deuxième partie : Etude expérimentale**

### **Chapitre 03 : Matériel et méthodes**

3.1. Echantillonnage .....	16
3.2. Isolement directe .....	16
3.3. Enrichissement .....	16
3.4. Production de cellulase.....	<b>17</b>
3.4.1. Préparation de l'inoculum .....	17
3.4.2. Milieu de production .....	17
3.5. Effets des conditions sur la production de cellulase .....	17
3.5.1. Effet de la variation de la température.....	17
3.5.2. Effet de la variation du pH .....	18
3.5.3. Effet des sources de carbone .....	18
3.5.4. Effet de la source d'azote .....	19
3.5.5. Effet du temps d'incubation .....	19

### **Chapitre 04 : Résultats et discussion**

4.1. Isolement des bactéries productrices de cellulase .....	20
4.2. Détection d'enzyme extracellulaire.....	20
4.3. Identification microscopique et biochimique .....	22
4.4. Effet de différents paramètres sur la production de cellulases .....	23
A. Effet de la température.....	23
B. Effet du pH.....	24
C. Effet des sources de carbone.....	25
D. Effet des sources d'azote.....	25
E. Effet de la période d'incubation .....	26
<b>Conclusion.....</b>	<b>28</b>
<b>Les références bibliographiques.....</b>	<b>29</b>

**Annexes**

**Résumé**

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Liste de quelque microorganismes cellulolytiques .....	9
<b>Tableau 2.</b> Les biotopes des hyperthemophiles.....	14
<b>Tableau 3.</b> Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens thermophiles producteurs de cellulase. ....	23

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Vue d'ensemble de la structure de la biomasse lignocellulosique.....	2
<b>Figure 2.</b> Présentation de la chaîne de cellulose.....	3
<b>Figure 3.</b> Présentation de la structure d'hemicellulose .....	4
<b>Figure 4.</b> Présentation de la structure de la lignine .....	4
<b>Figure 5.</b> Structure moléculaire de la cellulose .....	5
<b>Figure 6.</b> Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases.....	8
<b>Figure 7.</b> Dégradation de la cellulose colloïdale. C2 Hammam Bouhnifia/Mascara (source d'eau gazeuse).....	20
<b>Figure 8.</b> Détection de l'activité cellulase de l'hyperthermophile <i>Sulfolobus solfataricus</i> MT4. ....	21
<b>Figure 9.</b> Criblage d'isolats de bactéries thermophiles productrices de cellulase, (a) zone claire, (b) colonie bactérienne, et (c) milieu CMC inondé avec 1% de rouge de congo.....	22
<b>Figure 10.</b> Observation microscopique des microorganismes cellulolytiques isolées. C1 <i>Bacillus</i> (Gram-variable) avec une disposition comme une lettre chinoise. C4 Bactérie de grande taille a Gram positif. C6 <i>Bacillus</i> (Gram-variable). C11 Cocci encapsulé a Gram-positif .C18, C19 et C20 levures cellulolytiques thermophiles (X1800) .....	22
<b>Figure 11.</b> Effet de la température sur l'activité cellulase .....	24
<b>Figure 12.</b> Effet de ph sur la production de cellulase .....	25
<b>Figure 13.</b> Effet de la période d'incubation sur l'activité de cellulase.....	27

## Liste des abréviations

**BGL** : bêta-glucosidase .

**CBH** : cellobiohydrolases .

**CMC** : carboxyméthylcellulose

**CMCase** : carboxyméthylcellulase

**DNS** : Dinitrosalicylicacide

**EG** : endoglucanase.

# **Introduction**

# Introduction

La consommation massive des matériaux à base de pétrole entraîne la dévastation de l'environnement et le réchauffement climatique, qui sont des menaces mortelles pour l'humanité, la chimie verte est à l'origine du développement de la prochaine génération de matériaux, de produits et de procédés Biodégradable (Ahn *et al.*, 2012). Génère à partir de la biomasse renouvelable qui considère comme des matériaux promoteur pour remplacer les polymères synthétiques et réduire la dépendance mondiale aux combustibles fossiles (Isikgor et Becer, 2015).

La biomasse lignocellulosique est la ressource renouvelable la plus abondante dans la nature et une matière première prometteuse pour les industries de l'agriculture, de la biochimie et des biocarburants (Liu *et al.*, 2019). Elle est composée essentiellement de trois polymères, de la cellulose (38-50%), d'hémicellulose (23-32%) et de lignine (15-25%) avec de petites quantités de matières d'extractibles. (habal *et al.*, 2021). En raison de leur structure complexe la dégradation enzymatique complète nécessite l'action synergique de plusieurs glycosides hydrolases (GH), en particulier des cellulases (Wang *et al.*, 2019 ; Cao *et al.*, 2018).

Les cellulases parmi les enzymes industrielles les plus importantes connues à ce jour, elles convertissent la cellulose le composant majeure de matière lignocellulosique en glucose. Elles sont utilisées pour diverses applications telles que l'industrie des détergents, l'industrie textile, l'industrie du papier et la production d'éthanol lignocellulosique (Sukumaran *et al.*, 2005). Généralement, dans le domaine des biocarburants, l'hydrolyse enzymatique de cellulose se produit à 40-50°, ce qui est considéré comme un taux d'hydrolyse lent, caractérisé par de faibles rendements en sucre, une hydrolyse incomplète, une absence d'efficacité et leur sensibilité à la contamination microbienne. Ces limitations peuvent être résolues en utilisant des enzymes hautement thermostables produites par des micro-organismes thermophiles et hyperthermophile qui sont produits des cellulases présentent une grande stabilité et capables de résister à des températures plus élevées, ce qui offre plusieurs avantages, notamment l'augmentation de vitesse de réaction (Patel *et al.*, 2019 ; Ajeje *et al.*, 2019).

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'identification des microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase et l'effet des conditions pour une meilleure production de cellulase.

**Première partie :**  
**Synthèse bibliographique**

**Chapitre 01 :**  
**Généralités sur la**  
**cellulose et les cellulases**

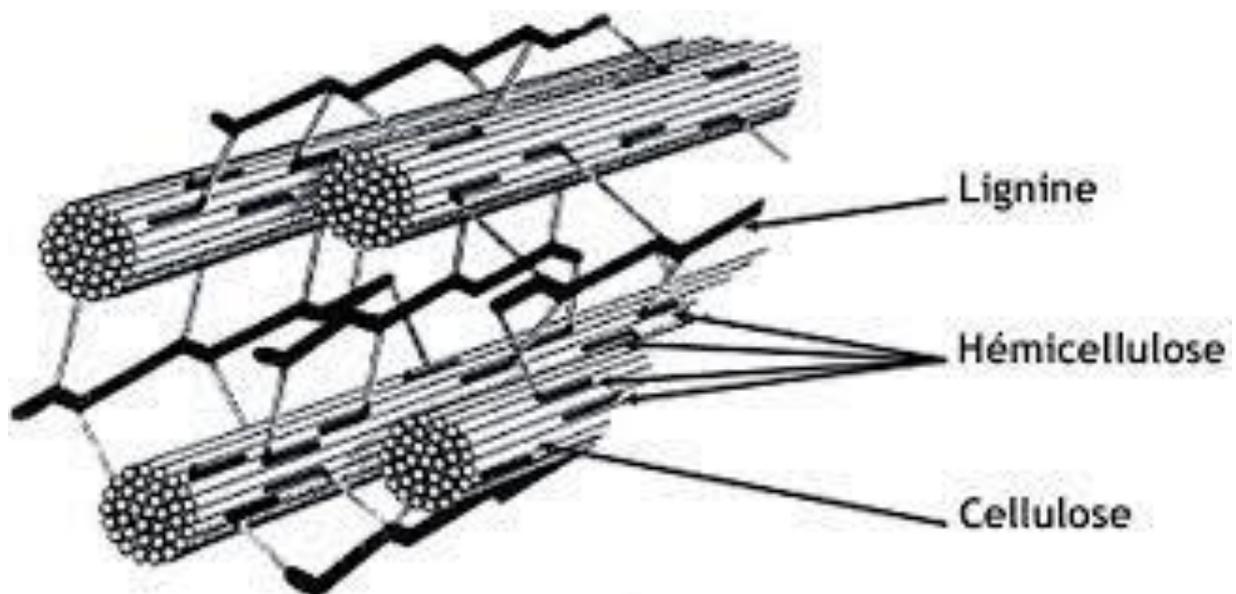
## Chapitre 01 : Généralités sur la cellulose et les cellulases

### 1.1. La biomasse ligno-cellulosique

#### 1.1.1. Définition

La définition générale de la biomasse est l'ensemble de la matière organique d'origine animal ou bien végétale. Environ 80% de la biomasse globale est principalement végétale tel que les plantes terrestres. La biomasse utilisée par les humains provient de diverses sources. En effet, elle est d'origine naturelle, cultivé (bois, herbes...) et peut être issue de résidus Industriels, d'agriculture ou de la consommation humaine (ordures ménagères) .

Cependant, La biomasse lignocellulosique est une des principales ressources renouvelables. Comme son nom l'indique, elle s'agit essentiellement de cellulose. Composée de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Contenant des faibles quantités de minéraux et d'extractibles. Ces derniers couvrent un grand nombre d'ingrédients pouvant être extraient avec des solvants organiques tels que l'éthanol, l'acétone ou le dichlorométhane . Certains de ces extractibles sont solubles dans l'eau.

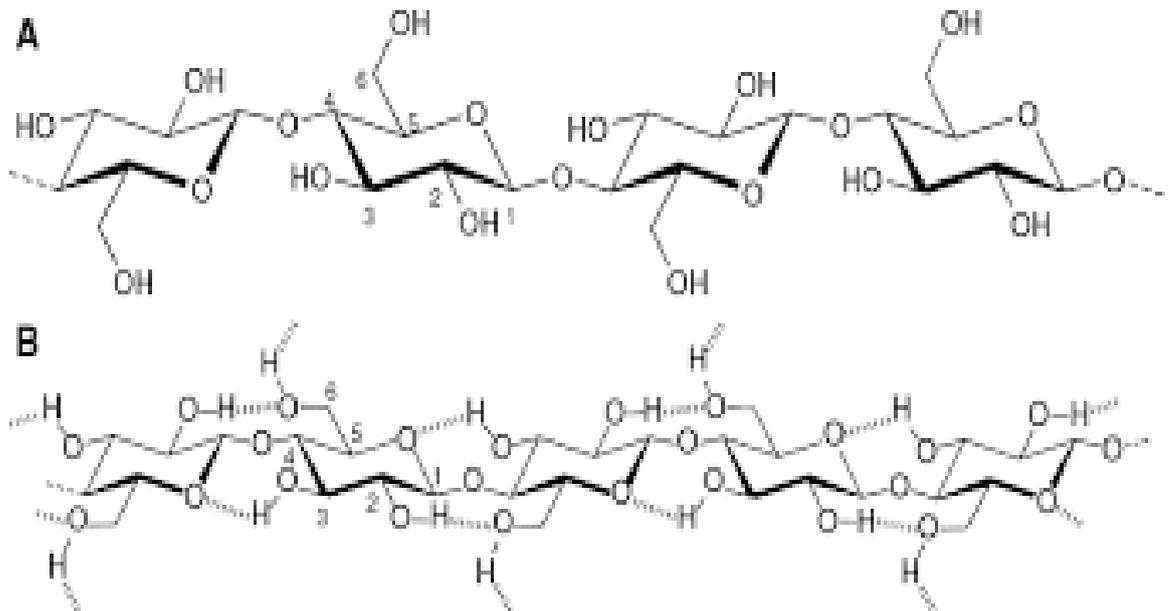


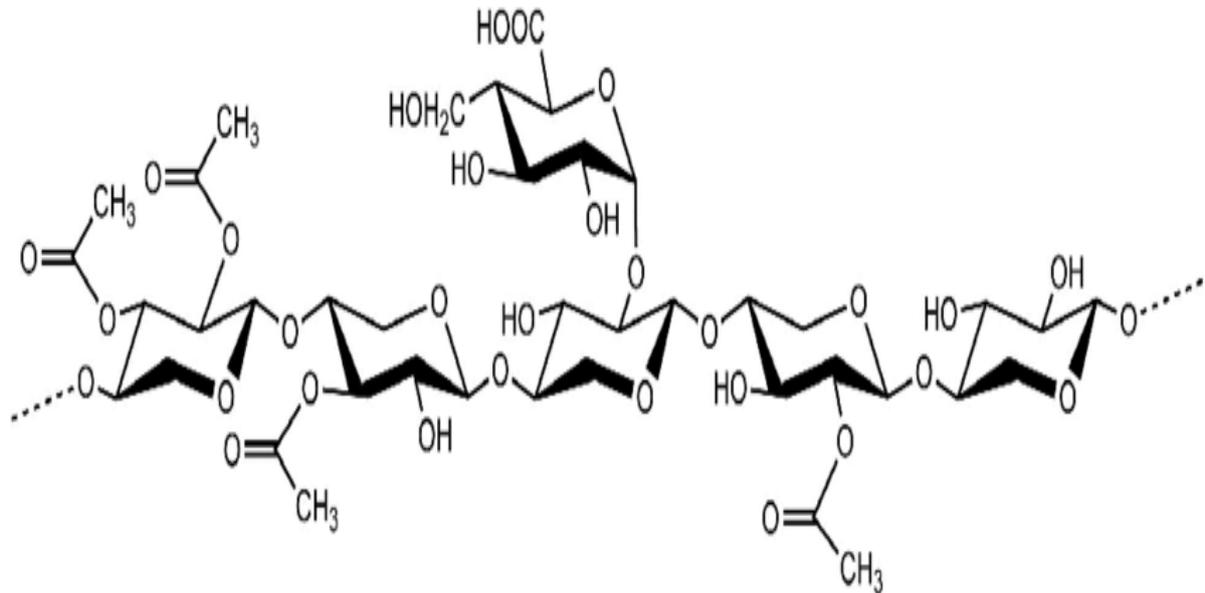
**Figure 1.** Vue d'ensemble de la structure de la biomasse lignocellulosique (Zhang *et al.*, 2006)

### 1.1.2. Sources et compositions

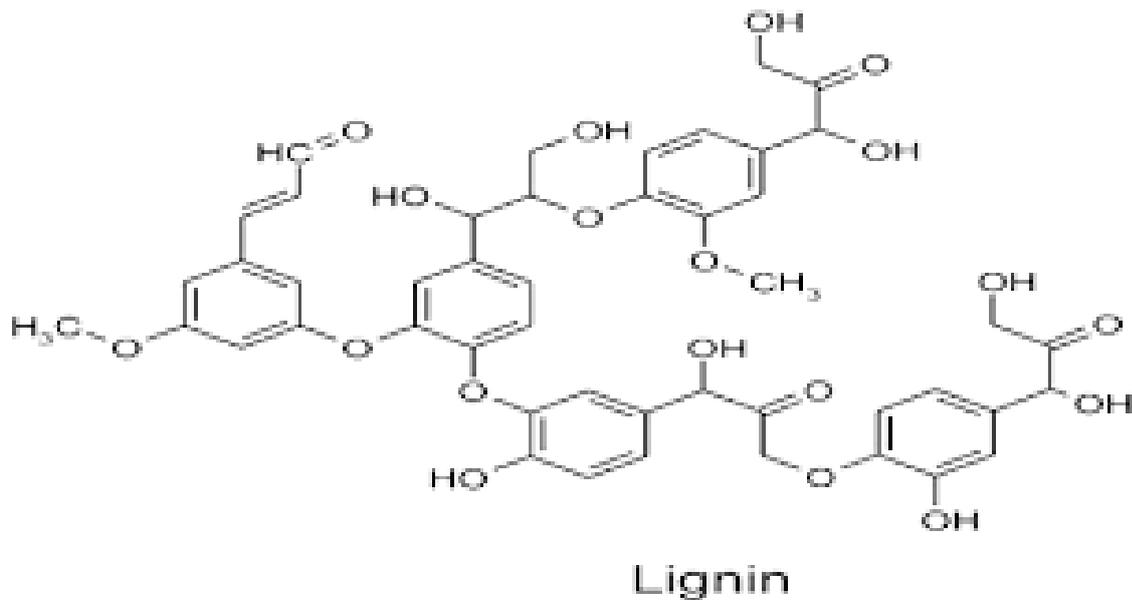
Elle appartient à plusieurs sources telles que l'agriculture (tiges de colza, rafles de maïs...), des résidus des exploitations forestières, déchets de l'industrie de bios et de papier et à partir de cultures précises de plantes annuelles, prénnes à rotation rapide (miscanthus..) (Boukari, 2010).

La paroi lignocellulosique est un complexe des fibres qui compose de cellulose, hémicellulose qui forme avec cellulose l'holocellulose (Spotti.M,2020) et lignine qui présente 30% de lignocellulose et assure la rigidité (Reid, 1995).





**Figure 3.**Présentation de la structure d'hemicellulose (Sassen , 1993) .



**Figure 4.**Présentation de la structure de la lignine (paillet , 2013).

## 1.2. La cellulose

### 1.2.1. Définition

La cellulose est un polymère d'origine naturelle parmi les très abondant sur terre (Bisaria et Ghose, 1981). Elle est produite essentiellement par le processus biochimique de photosynthèse.

Ces molécules de cellulose sont présentes dans toutes les espèces végétales sous la forme de fibrilles en des variables proportions ; 40 à 49 % de la matière sèche chez les résineux ou conifère (pin, sapin, épicéa) et 30 à 40 % chez les feuillus (peuplier, hêtre, charme) (Marouf et Tremblin, 2009).

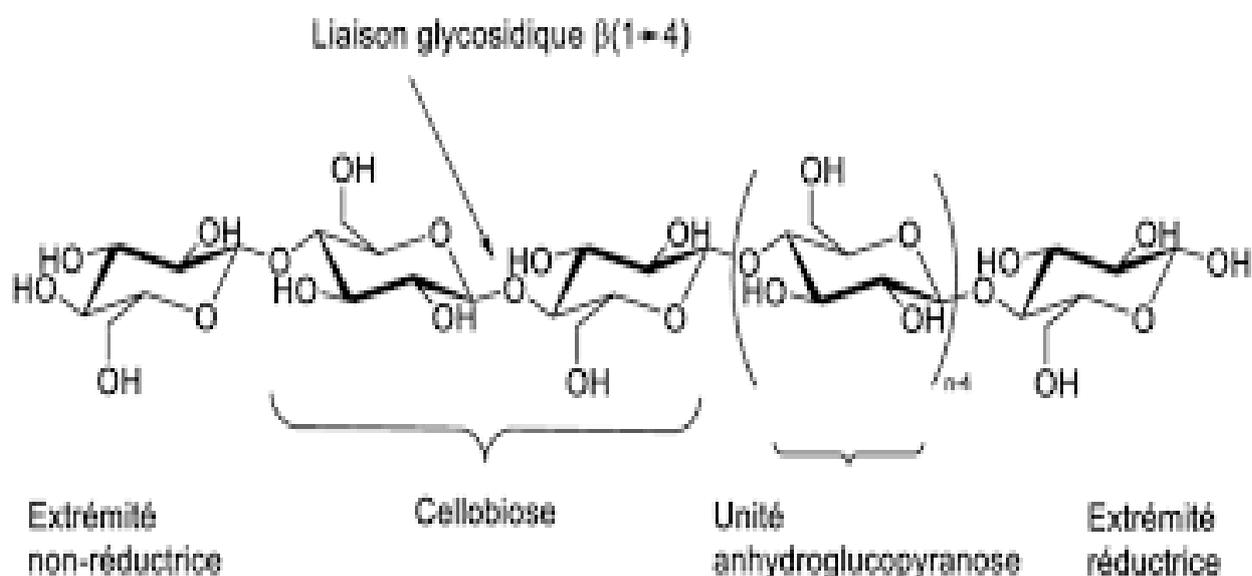
### 1.2.2. Structure

Biochimiquement, la cellulose est un homopolysaccharide constitué de longues chaînes insolubles et linéaires, composé d'unités D-anhydroglucopyranose reliées entre elles par des liaisons osidiques de type  $\beta$ -1,4 (Zhang *et al.*, 2006 ; Chundawat *et al.*, 2011).

L'unité qui se répète dans les fibrilles de cellulose est la cellobiose, qui est un dimère de cellulose. (Figure 1) Il est constitué de deux type de structure :

**Une structure cristalline :** C'est la structure la plus résistante résulte par association des chaîne linéaire de cellulose par des liaisons hydrogène où il est difficile de détruire (Bensmira, 2006).

**Une structure amorphe :** Structure très facile à décomposer et hydrolyser car elle ne possède pas des liaisons qui maintiennent sa dureté et sa rigidité (Bensmira, 2006).



**Figure 5.** Structure moléculaire de la cellulose (Brown, 2004).

### 1.3. Les hémicelluloses

L'hémicellulose est un polysaccharide non cellulosique et diffère de la cellulose en ce qu'il s'agit d'un polymère hétérogène à chaînes ramifiées plus courtes (hétéropolysaccharide)

(Bensmira, 2006). Il représente 33 % de la biomasse non traitée. Après transformation, cette fraction est essentiellement composée de pentose (comme la xylose) et de glucose.

### 1.4. La lignine et les extractibles

La lignine se trouve dans l'espace qui maintient ensemble les chaînes de cellulose et d'hémicellulose. Ils contiennent des molécules aux propriétés pharmaceutiques importantes (trapézoïdes, stéroïdes, composés phénoliques et inorganiques). Peut réduire le rendement de la fermentation alcoolique (Zhang, *et al* 2013) (Bensmira, 2006). Ainsi que les extractibles sont des substances pouvant être extraites du bois par des quantités plus ou moins importantes désignés comme :

- Les résines : sont des molécules formées à partir d'acides gras tels que la térébenthine, l'acide abiétique (ou colophane), l'huile de pin et les terpènes.

- Les tanins sont des composés phénoliques obtenus notamment à partir des écorces de pin mimosa, de chêne et de châtaignier.

- Huile aromatique (huile sugi, huile CAD).

- Sucre hydrosoluble (sucre d'érable).

- Latex qui remplace le caoutchouc (latex de caoutchouc) (Percival *et al.*, 2006).

### 1.5. Les cellulases

#### 1.5.1. Définition

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- $\beta$ -D-Glucanohydrolase] (Kader *et al.*, 1999) sont des enzymes agissant ensemble et hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques dans les chaînes de cellulose (Zhang, *et al.*, 2013).

#### 1.5.2. Nomenclature des cellulases

- Nom codifié : E.C.3.2.1.4

- Nom systématique : 1, 4-(1, 3;1, 4)-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase.

- Nom recommandé : Cellulase

- Synonymes : Endo-1, 4-beta-glucanase, beta.-1, 4-glucanase, Endo-1, 4-beta-D-glucanase, Endoglucanase D, Celludextrinase, Avicelase, Paneellase SS, (Schomburg et Salzman, 1991).

### **1.5.3. Quelques caractéristiques**

#### **1.5.3.1. Réaction et spécificité**

La réaction est représenté par hydrolyse interne des liaisons 1,4- $\beta$ -D-glycosidiques dans la cellulose, lignine et Les céréales et également les liaisons 1,4 et 1,3 en  $\beta$ -D-glucane ( Schomburg et salzman, 1991).

#### **1.5.3.2. Les inhibiteurs**

Les inhibiteurs sont des composés naturels ou chimiques qui ont un effet sur la vitesse des réactions enzymatiques, parmi les inhibiteurs de l'activité cellulasique : Hg<sup>+2</sup> (récupéré par la cystéine ou NaCl) ; fer<sup>+2</sup> ; N-bromosuccinimide Amine ; dextrane, pyrocarbonate d'éthyle ( Schumberg et Salzman, 1991).

#### **1.5.3.3. Activité enzymatique**

L'activité cellulasique est exprimée en unités internationales. Elle correspond à la quantité d'enzymes dégradant la carboxymethylcellulose(CMC) en carbohydrates réduits (1 micromole de glucose par minute) (Schulein, 1988).

#### **1.5.3.4. Poids moléculaire**

Les cellulases ont des poids moléculaires très variables, dépendant largement de leur source. Certaines endoglucanases ont un poids moléculaire de 30 à 90 KDa, tandis que d'autres sont beaucoup plus petites, autour de 13 KDa . Les exoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 50 KDa , tandis que les  $\beta$ -glucosidases ont des poids moléculaires plus élevés allant de 90 à 240 KDa (reffas , 2017) .

#### **1.5.3.5. Température optimale**

La température optimale pour les cellulases fongiques variait entre 40 et 70°C, tandis que Les bactéries varient entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation dans l'industrie textile (Ando *et al.*, 2002).

### **1.5.4. Mécanisme de cellulase**

Le mécanisme d'hydrolyse enzymatique des cellulases sur le cellulose implique l'action synergique de ces trois enzymes :endoglucanase( EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) et and  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) , la participation de trois types de cellulases forme un complexe multi-enzymatique (filho, 2013).

Endoglucanases :

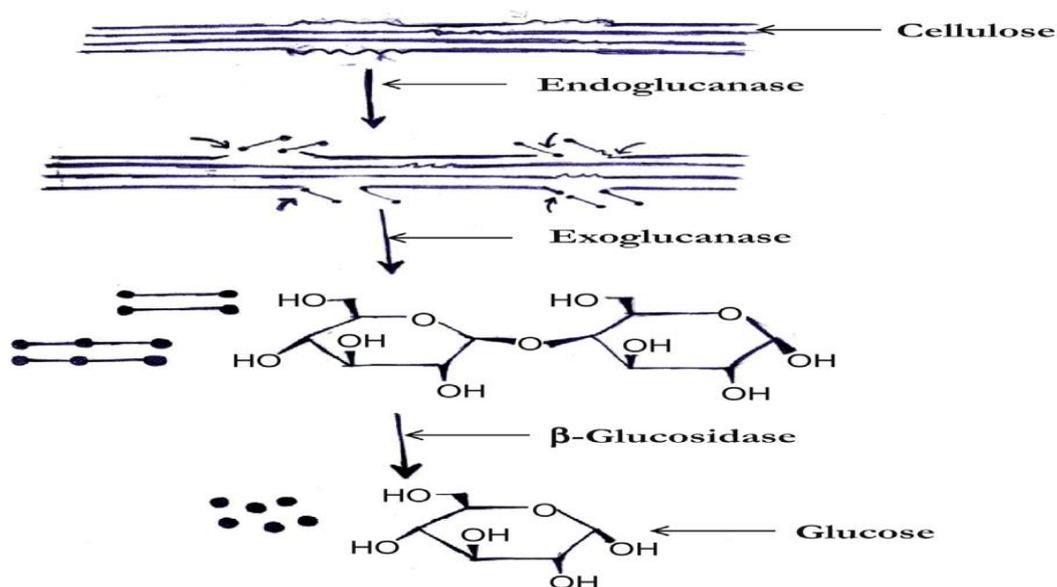
Les endoglucanases (EG) clivent de manière aléatoire les sites amorphes internes des chaînes de polysaccharides cellulosiques, ce qui libèrent oligosaccharides de différentes longueurs en insérant une molécule d'eau dans la liaison 1,4- $\beta$  oligosaccharides et créent de nouvelles extrémités réductrices et non réductrices (Gupta et verma, 2015) qui sont sensibles à l'action ultérieure de l'exoglucanase (Abdel-Azeem et *al.*, 2021).

Exoglucanases ou exo- $\beta$ -glucanases :

Également appelées cellobiohydrolases (CBH), ces enzymes catalysent l'hydrolyse successive des résidus des extrémités réductrices et non réductrices de la cellulose et libérant des molécules de cellobiose qui sont hydrolysées par les  $\beta$ -glucosidases. (Castaneda et Mallol, 2013).

$\beta$ -Glucosidase :

La bêta-glucosidase (BGL) est le troisième et dernier composant majeur du complexe cellulase. IL hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques de cellobiose. Convertit le cellobiose en glucose et en même temps, ils éliminent les intermédiaires qui agissent comme inhibiteurs d'EG et de CBH (Abdel-Azeem et *al.*, 2021)



**Figure 6.**Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases ( Chakraborty *et al.*, 2016).

## 1.6. Les Microorganismes cellulolytique

Les microorganismes dégradant la cellulose sont connus sous le nom des microorganismes cellulolytiques (Wilson, 2011), cette dégradation fait par enzymes

cellulases qui synthétisées par une grande diversité de microorganismes, y compris des champignons et des bactéries (zhang *et al.*, 2007).

**Les champignons** : sont essentiellement des décomposeurs de matière organique, elle possède donc un système enzymatique permettant dégrader notamment des substrats celluloses (Kuhad *et al.*, 1997). La souche référence de cette flore fongique étant *Trichoderma reesei* est un champignon saprophyte filamenteux décomposant le bois ( la pourriture molle ) capable de produire de la cellulase. la concentration maximale de protéines extracellulaires il a été rapporté que la cellulase de T.reesei atteint 100 g/L. Par conséquent, cet ascomycète est également considéré comme un hôte prometteur pour la production de protéines hétérologue (Gao *et al.*, 2018).

On distingue aussi les champignons de pourriture blanche, *Phanerochaete*. sp a été largement étudié. Outre la pourriture brune (par exemple *Fomitopsis .sp*) (Deswal *et al.*, 2011).

**Les bactéries** : Les bactéries anaérobies et aérobies ont des stratégies différentes pour dégrader les substrats cellulolytiques ; alors que les bactéries anaérobies dégradent la cellulose en utilisant des cellulosomes et les bactéries aérobies sécrètent des enzymes capables de dégrader la cellulose qui diffusent librement pour atteindre le substrat ( Castaneda et Mallo, 2013).

*Clostridium cellulolyticum* est la bacterie mésophile anaérobies qui produisent des complexes macromoléculaires cellulolytiques extracellulaires appelés cellulosomes qui permettent aux bactéries de se développer a partir la cellulose cristalline comme un seule source de carbone et d'énergie (leory *et al.*, 1998).

**Tableau 1.** liste de quelque microorganismes cellulolytiques (Kuhad *et al.*, 2011).

Champignons	<p>La pourriture molle :</p> <p><i>Aspergillus niger</i>; <i>A. nidulans</i>; <i>A. oryzae</i>; <i>A. terreus</i>; <i>Fusarium solani</i>; <i>F. oxysporum</i>; <i>Humicola insolens</i>; <i>H. grisea</i>; <i>Melanocarpus albomyces</i>; <i>Penicillium brasilianum</i> ; <i>P. occitanis</i> ; <i>P. decumbans</i>; <i>Trichoderma reesei</i>; <i>T. longibrachiatum</i>; <i>T. harzianum</i>; <i>Chaetomium cellulolyticum</i>; <i>C. thermophilum</i>; <i>Neurospora crassa</i>; <i>P. fumigosum</i>; <i>Thermoascus aurantiacus</i>; <i>Mucor circinelloides</i>; <i>P. janthinellum</i>; <i>Paecilomyces inflatus</i>; <i>P. echinulatum</i>; <i>Trichoderma atroviride</i></p>
-------------	--

	<p>la pourriture brune :</p> <p><i>Coniophora puteana; Lanzites trabeum; Poria placenta; Tyromyces palustris; Fomitopsis sp.</i></p> <p>La pourriture blanche</p> <p><i>Phanerochaete chrysosporium; Sporotrichum thermophile; Trametes versicolor; Agaricus arvensis; Pleurotus ostreatus; Phlebia gigantean</i></p>
Bactéries	<p>Aérobie :</p> <p><i>Acinetobacter junii; A. amitratus; Acidothermus cellulolyticus; Anoxybacillus sp.; Bacillus subtilis; B. pumilus; B. amyloliquefaciens; B. licheniformis; B. circulans; B. flexus; Bacteriodes sp.; Cellulomonas biazotea; Cellvibrio gilvus; Eubacterium cellulosolvens; Geobacillus sp.; Microbispora bispora; Paenibacillus curdlanolyticus; Pseudomonas cellulosa; Salinivibrio sp.; Rhodothermus marinus</i></p> <p>anaérobie:</p> <p><i>Acetivibrio cellulolyticus; Butyrivibrio fibrisolvens; Clostridium thermocellum; C. cellulolyticum; C. acetobutylium; C. papyrosolvens; Fibrobacter succinogenes; Ruminococcus albus</i></p>
Actinomycètes	<p><i>Cellulomonas fimi; C. bioazotea; C. uda; Streptomyces drozdowiczii; S. lividans; Thermomonospora fusca; T. curvata</i></p>

### 1.7. Applications des cellulases

En agriculture : notamment pour le production de fourrage et améliorer leur valeur nutritif (Nekleva et krasinko , 2014) ont utilise des méthodes enzymatique à la cellulase pour permettre une bonne prévision de la digestibilité de matière organique des fourrages (aufrene et michalet-Doreau, 1990).

Pâte à papier et papeterie : la cellulase est résistante et stable à haut ph et température avec une grande potentielle application dans l'industrie des pâtes et papiers (Cui *et al.* ,2005), cette enzyme ont été signalés pour améliorer la concentration la pâte à papies dissoudre et contrôler leur viscosité (yang *et al.*, 2019).

En détergents : À l'échelle industrielle, les enzymes sont principalement utilisées comme additifs de détergents ayant un action nettoyante par décomposer les liaisons

chimiques présentes dans la saleté sans endommager les fibre, parmi ce enzyme le cellulase de *Streptomyces thermoviolaceus* (rigotti *et al.*, 2018).

Industries agroalimentaires : La cellulase utilisé dans le traitement des jus augmente extraction et clarification des jus avec la macération des nectars des fruits en cassant les chaines cellulosiques dans les tissus vegetaux. Les cellulases peuvent contribuer à l'étape du pressage pour augmenter les rendements (Uzener et Cekmecioglu, 2019).

**Chapitre 02 :**  
**Microorganismes**  
**hyperthermophiles**  
**producteurs de cellulase**

## Chapitre 02 : Les microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase

### 2.1.L'extremophilie

La vie microbienne ne semble pas se limiter à un environnement spécifique. Au cours des dernières décennies, il est devenu clair que les communautés microbiennes peuvent exister dans les conditions les plus diverses, y compris les extrêmes de température, de pression, de salinité et de pH. Ces microorganismes, connus sous le nom d'extrémophiles, produisent des biocatalyseurs qui fonctionnent dans des conditions extrêmes (Burg, 2003). Kristjansson et Hregvidsson proposent aussi une définition des habitats extrêmes, c'est un milieu dont un des facteurs environnementaux sort de la gamme observée pour un environnement normal ( biotope normale caractérisé par une température entre 4°C-40°C , pH entre 5 -8.5).alors les microorganismes extrémophiles se qualifie de : psychrophile (faible température) , thermophile (forte température) , acidophile (pH acide) , alcalophile (pH alcalin) et halophile(forte concentration de sel).

#### 2.1.1. Les microorganismes thermophiles

Les thermophiles sont des organismes qui peuvent vivre à des températures comprises entre 50 et 70°C. Ils peuvent croître entre 25 et 40°C, mais s'affaiblir. Au sein de différents groupes d'eucaryotes se trouvent des protozoaires, des champignons, des algues et d'autres organismes thermophiles, ainsi que des procaryotes tels que les streptomycètes, les cyanobactéries, le crostrium et le bacille (Lossouarn, 2014). Les eucaryotes connus ne peuvent pas vivre au dessus de 60°C. La bactérie *Thermus aquaticus* est un exemple d'organisme thermophile. La stabilité thermique élevée de son ADN polymérase est utilisée dans la réaction en chaîne par polymérase (Desvaux , 2001) .

Une définition plus pratique et plus large a été proposée par Karl Stetter qui montre que les organismes thermophiles sont tous les organismes qui se développent à des températures supérieures à 45°C. Cette dernière définition est intéressante car elle définit quatre sous-catégories au sein des thermophiles :

**Thermophiles modérés** : les conditions de croissance optimales se situent entre

- 55 et 65°C.

**Thermophiles extrêmes** : leurs température de croissance optimale se situe entre

- 65-80°C.

**Hyperthermophiles** : température de croissance optimale plus que 80 degrés C.

**Hyperthermophiles extrêmes** : leurs températures de croissance optimale

105 ° C ou plus.

Des micro-organismes thermophiles ont été isolés des environnements naturels et exposés à l'activité volcanique ou géothermique (cheminées hydrothermales profondes, sources..) pas seulement des terres chaudes mais aussi des biotopes artificiels chauds (Conduites d'eau chaude, installations industrielles, etc.) (Alain *et al.*, 2010).

### **2.1.1.1. Phylogénie des procaryotes thermophiles**

Des études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ARN ribosomique ont révélé l'existence de trois domaines différents. Deux d'entre eux sont liés aux bactéries procaryotes et aux archées, et le troisième domaine regroupe les eucaryotes eukarya. Cette division est confirmée par les résultats génomiques (Quérellou et Guézennec, 2010).

Les micro-organismes thermophiles appartiennent à deux domaines de la vie, les bactéries et les archées, comme le suggère Alain. Annexe(2)

### **2.1.2. Les hyperthermophiles**

Les organismes hyperthermophiles sont des organismes qui peuvent survivre et se reproduire de manière optimale à des températures supérieures à 80°C (comprise entre 80 et 110°C). Il ne peut pas pousser à des températures inférieures à 60 ° C (Joshua I. , 2011). Ils ne sont actuellement représentés que par des procaryotes, certaines bactéries, et surtout des archées. Parmi les bactéries il y a des organismes phototrophes anoxygéniques (qui peuvent photosynthétiser et vivre sans oxygène), des cyanobactéries qui peuvent vivre à 70-73°C, et certains chimiotrophes qui vivent dans des environnements jusqu'à 95°C. Il existe d'autres microorganismes tels que , *Aquif exyrophilus* et *Thermotoga maritima* avec une croissance optimale à 95°C et 90°C, respectivement. Les hyperthermophiles les plus extrêmes et les plus courants sont les archées appartenant, par exemple, aux genres *Pyrococcus*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Pyrodictium*, *Hyperthermus* ou *Pyrolobus* (Desvaux, 2001). L'organisme le plus extrême de ce dernier genre est l'archaea *Pyrolobus fumarii*, qui a été isolée par des fumeurs des bouches hydrothermales de l'océan Atlantique et détient des records de température. Reproduit jusqu'à 113°C au lieu de moins de 90°C (mais même sous très haute pression)( Joshua I. , 2011).

### 2.1.2.1. Biotopes des hyperthermophiles

Des microorganismes hyperthermophiles ont été isolés à partir des régions volcaniques, le biotope terrestre est principalement des champs contenant de soufre et le biotope marin à haute température constitués des fortes concentrations de NaCl et de sulfate (Stetter, 1999) (Huber *et al.*, 2000). Le tableau suivant présente certaines caractéristiques de biotope des hyperthermophiles.

**Tableau 2.** Les biotopes des hyperthermophiles (Stetter, 1999)

caractérisation	Biotope terrestre	Biotope marin
Site	Champs de solfatare sol chauffe à la vapeur	Sources chaudes sous-marines.
température	En surface, jusqu'à 100 °C Profondeur : au-dessus de 100 °C	Jusqu'à ~400 °C
Salinité	faible (0,1-0,5% de sel)	Généralement ~3% de sel
Ph	faible (0,1-0,5% de sel)	5–8.5 (rare: 3)
Besoins nutritifs	H <sub>2</sub> O , CO <sup>2</sup> , CO, CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, S <sub>0</sub> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ), NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , O <sub>2</sub> (surface)	

### 2.1.3. Microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase

La recherche de nouvelles enzymes microbiennes thermostables présente un réel intérêt. L'identification des microorganismes hyperthermophiles capables de se reproduire à des températures supérieures à 80°C et principalement représentés par les Archaea qui ont été permis d'obtenir plus systématiquement des enzymes très thermostables. En raison de leurs propriétés qui sont souvent associées à leur stabilité élevée à facteurs dénaturants (forte force ionique, pH extrême, solvants organiques, etc...) , ces enzymes thermostables pourraient combler le fossé entre les processus industriels biologiques et chimiques (Cornec *et al.*, 1997).

#### Archée :

*Desulfurococcus fermentans* : un archée appartenant à la famille des Desulfurococcaceae, c'est le premier archéa cellulolytique connu, Il a été isolé d'une source chaude d'eau douce de la caldeira d'Uzon sur la péninsule de Kamchatka, Russie. Ce microorganisme est anaérobie obligatoire se développe de façon optimale à des températures

de 80 à 82°C. Il fermente la cellulose et divers autres hydrates de carbone (fructose, lactose, etc.) (Susanti *et al.*, 2012).

*Pyrococcus horikoshii* : un archée anaérobie hétérotrophe obligatoire, Leur croissance est optimale à 98 °C (température de croissance maximale : 102 °C), mais capables de survivre longtemps à 105°C (González *et al.*, 1998). Il produit un hyperthermostable endoglucanase capable de dégrader le cellulose cristalline (Kang *et al.*, 2007).

**Bactérie :**

*Thermotoga maritima* : est une bactérie anaérobie extremophile isolée à partir de surfaces océaniques chauffées géothermiquement, se développant à des températures allant jusqu'à 90 °C (Abramson, 1995), le cellulase de ce hyperthermophile produit au moins deux types d'activité cellulase et un  $\beta$ -glucosidase (Cornec *et al.*, 1997).

**Deuxième partie :**  
**Etude expérimentale**

# **Chapitre 03 :**

## **Matériel et méthodes**

## Chapitre 03 : Matériel et méthodes

Compte tenu de la situation épidémiologique sanitaire récente (Covid 19), nous sommes incapables de réaliser la partie pratique, et nous sommes appuyés sur l'analyse et la discussion de certains articles scientifiques visant à acquérir des spécificités et des informations sur notre sujet.

Dans cette présentation de travail, nous avons discuté de l'inclusion de certains concepts et méthodes qui peuvent aider à obtenir de bons résultats peuvent être prise en compte.

Cette partie résume et clarifier ce que les chercheurs et les auteurs des articles que nous avons analysés ont fait pendant leurs expériences.

### 3.1.Echantillonnage

Des échantillons d'eau et de sol ont été recueillis dans des contenants stériles de Hammam Pharaoh ; une source chaude égyptienne sur la plage de la mer rouge. Selon les endroits, la température de l'eau était variée entre de 70°C et 90°C. Avec un pH d'eau d'environ 7.5 pour isoler des souches bactériennes productrices de cellulases thermophiles (Ibrahim et El-diwany, 2007).

### 3.2. Isolement directe

L'échantillon de sol recueilli a été mis en suspension et dilué en série avec de l'eau distillé jusqu'à  $10^{-4}$ . 100 µl de chaque diluant et échantillon d'eau (sans diluant) ont été ensemencés sur plaques de gélose et incubés à 70°C pendant 1 à 2 semaines. Les plaques ont été colorées avec du rouge Congo, décolorés avec une solution de NaCl 1 M et notés pour un halo clair entourant les colonies (Ibrahim et El-diwany, 2007).

### 3.3. Enrichissement

Pour enrichir les échantillons d'eau et de sol avec des souches bactériennes productrices de cellulase thermophiles, les échantillons ont été mélangés avec 5 g de CMC et 5 g d'Avicel, mélangés et incubés à 70°C pendant 3 à 4 semaines. Les échantillons ont été dilués avec de l'eau distillée stérile, étalés sur milieu gélosé et incubés à 70°C pendant 1 à 2 semaines. Les milieux gélosés comprennent l'acide nitrilotriacétique (100 mg/l), CaSO (60 mg/l), DDL (100 mg/l), KNO<sub>3</sub> (103 mg/l), NaNO (689 mg/l), contient du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (111 mg/l), MnSO (2,2 mg/l), ZnSO<sub>4</sub> (0,5 mg/l), CuSO (0,016 mg/l), HBO (mg/l), CoCl (0,046

mg/l), FeCl (0,28 mg/l), 1 g/l de tryptone, 1 g/l d'extrait de levure, 10 g/l à partir de CMC et 25 g/L de gélose (Ibrahim et El-diwany, 2007).

### **3.4. Production de cellulase**

#### **3.4.1. Préparation de l'inoculum**

D'après Sethi *et al.* (2003), les moisissures qui ont été utilisé dans cette partie sont ;

- Une souche performante ayant réagi activement au test d'activité cellulolytique à partir d'échantillons de sol prélevés près de la source thermale de Guelma, cette souche c'est *Trichoderma* "GHL" qui a été isolée au Laboratoire d'Ingénierie Enzymatique de l'université Constantine 1 (Algérie) (Février 2007). La souche a été identifiée comme *Trichoderma longibrachiatum* Rifai par DSMZ (Deutsche Sammlung Von Mikroorganisationen und Zellkulturen GmbH).

- Une Souche référence *Trichoderma reesei* Rut C-30 VTT-D-86271 de l'Institut national finlandais de la recherche technologie. Les souches ont été maintenues en milieu PDA et incubées à 30°C pour la souche référence et à 35°C pour les souches isolées jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores. Après formation de spores de moisissures, les spores ont été récupérées en ajoutant 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,1 % de Tween 80 (Sigma Aldrich). La concentration de spores a été déterminée par dénombrer les dilutions appropriées dans des cellules de Thoma (Gautam *et al.*, 2011) .

#### **3.4.2. Milieu de production**

Le milieu synthétique utilisé pour produire la cellulase dans le processus de fermentation submergée a été proposé par Mandels et Weber (1969) avec un pH initial du milieu de 5,5. Préalablement à l'ensemencement, le milieu a été stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

### **3.5. Effets des conditions sur la production de cellulase**

#### **3.5.1. Effet de la variation de la température**

Un total de 10 flacons agitateurs (250 ml) , Chacun contenait 50 ml de milieu de sel minéral standard stérile Solka-Floc (1 % p/v, pH 4) ont été inoculés avec 1 ml de suspension de spores de *Thielavia terrestris*. Chaque flacon a été incubé dans un agitateur orbital (200 rpm) à 36, 40, 44, 48 ou 52°C pendant 24 heures. Le filtrat de culture obtenu a été traité et analysé pour diverses activités enzymatiques (Argyrios et Rosemina, 1986).

### 3.5.2. Effet de la variation du pH

L'effet du pH initial sur la croissance fongique et la production de cellulase a été étudié dans un bioréacteur à cuve agitée de 14 L (New Brunswick Scientific, NJ). Dans cette étude, le pH du milieu de fermentation a été ajusté à la valeur souhaitée (pH 3, 3.5, 4, 5, 6 ou 7). Ils ont été surveillés le pH pendant la fermentation et constatés qu'il augmentait avec le temps lorsque le pH initial était de 3. La température a été maintenue à 48°C tout en réglant les vitesses d'aération et d'agitation à 1 v.v.m et 100 rpm, respectivement. Un échantillon de 50 ml a été prélevé régulièrement et analysé pour la FPase (une mesure de l'activité cellulase totale) et la teneur en protéines cellulaires pour estimer la croissance fongique.

L'étude de pH contrôlé a été effectuée comme décrit ci-dessus, sauf que le pH du milieu a été ajusté à la valeur souhaitée (4, 4.5, 5, 5.5 ou 6) et surveillé immédiatement après l'inoculation (Argyrios et Rosemina, 1986).

### 3.5.3. Effet des sources de carbone

Sethi *et al.* (2013) ont mentionnés que les effets de diverses sources de carbone telles que l'amidon, le glucose, le maltose et le fructose à des concentrations de 1 à 5 % ont été étudiés dans le milieu de production. Les effets de divers composés carbonés, à savoir la cellulose, la CMC et le glucose ont été utilisés dans l'étude. Le bouillon a été distribué dans des flacons, 0,5 à 3 % de chaque source de carbone ont été ajoutés avant l'inoculation du stock et de la culture, et les flacons ont été incubés à  $45 \pm 2$  °C pendant 5 jours (Gautam *et al.*, 2011). Ont montré une étude de diverses sources de carbone telles que la cellulose, le carboxyméthyle et le glucose en tant que source de carbone unique du même niveau (1%) du milieu de base fongique. 100 ml de chaque milieu de base préparé à partir de différentes sources de carbone ont été distribués dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml et stérilisés à 121°C.

Après refroidissement pendant 15 minutes, inoculer un disque de 5 mm de la culture de mycélium pleurote. Le flacon a été incubé à 30°C sur un incubateur à agitation (120 rpm) pendant 6 jours. Après cette période, les enzymes extracellulaires présentes dans le filtrat de culture ont été recueillies par filtration. Le filtrat de culture a ensuite été centrifugé et le surnageant clair a été analysé pour l'activité cellulase. La couleur développée a été lue avec un spectrophotomètre (Elsebaay *et al.*, 2018).

Les sources de carbone suivantes ont été testées pour identifier des sources de carbone appropriées pour la production de cellulase par l'organisme test. Le milieu de production contenant la carboxyméthylcellulose qui fonctionne comme une source de carbone, puis ont

été le remplacé par le glucose. Ces sources de carbone ont été testées individuellement à la concentration 1 % sur substrat sec (Sreeja *et al.*, 2013).

#### **3.5.4. Effet de la source d'azote**

Diverses sources d'azote telles que l'extrait de levure, la peptone, l'urée et le sulfate d'ammonium ont été étudiées pour leurs effets sur la production d'enzymes (Sethi *et al.*, 2013). Pour ce que nous intéresse c'est l'étude d'effet de la source d'azote. Alors, dans cette étude ils ont été déterminer la source d'azote appropriée pour la production de cellulase du *Aspergillus niger* et de *Trichoderma*. Au lieu d'une source d'azote donnée dans le milieu de fermentation, 0,5 à 3,0 % de composés biologiques et inorganiques (peptone, extrait de bœuf, nitrate d'ammonium, nitrate de sodium et extrait de levure) ont été ajoutés (Gautam *et al.*, 2011). La source d'azote dans le milieu de base du champignon a été remplacer par une autre source de base biologique, une source d'asile bovine et 100 ml d'une source d'azote inorganique telle que le chlorure d'ammonium, le sulfate d'ammonium, l'extrait de levure utilisé comme un contrôleur.

Les milieux ont été Verser dans des erlenmeyers de 250 ml de chaque milieu de base préparé à partir de différentes sources d'azote, puis une stérilisation à 121°C pendant 15 minutes suivi d'un refroidissement. Inoculation d'un disque de 5 mm de la culture de mycélium de *Pleurotus* souhaitée. Le flacon a été incubé dans une étuve à agitation (120 rpm) à 30°C pendant 6 jours. Après culture, l'enzyme produite dans le filtrat de culture a été obtenue. Le filtrat de culture a ensuite été centrifugé et le surnageant clair a été analysé pour l'activité cellulase. La couleur développée a été lue avec un spectrophotomètre (Elsebaay *et al.*, 2018).

#### **3.5.5. Effet du temps d'incubation**

Dans cette partie les souches isolées ont été cultivées en milieu concentré jusqu'à la phase exponentielle de croissance. La culture a ensuite été transférée dans 100 ml de milieu Mandel et Reese dans un flacon de 250 ml et incubée à 70°C avec agitation à 170 rpm. Le surnageant a été recueilli à des intervalles de 24 heures pendant jusqu'à 168 heures. L'activité CMC<sub>Case</sub> a été estimée à l'aide du réactif DNS (Laddawan *et al.*, 2017).

# **Chapitre 04 :**

## **Résultats et discussion**

## Chapitre 04 : Résultats et discussion

### 4.1. Isolement des bactéries productrices de cellulase

Cette étude a été basée sur la recherche des microorganismes qui sont capables de survivre à haute température dans des sources chaudes et dégrader la cellulose comme une matière première. Après 72 h de croissance des isolats de différentes sources thermales provenant de l'ouest de l'Algérie ; deux hyperthermophiles avec un nombre des thermophiles ont été détectés (Figure 1) (Khelil et Cheba, 2014).

Le même résultat a été observé dans une recherche faite en Indonésie, 18 isolats bactériennes thermophiles ont été récupérés à différentes températures à partir d'une source thermale : cinq isolats à 70°C, 6 isolats à 60°C et sept isolats à 50°C (Khalila *et al.*, 2020).

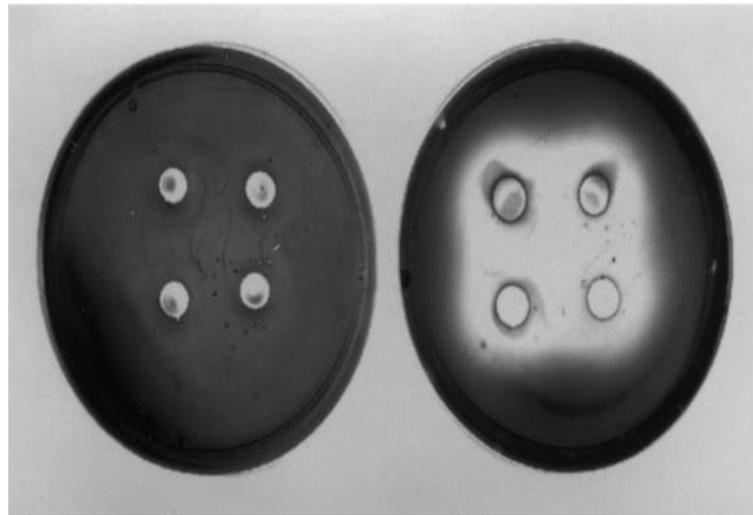


**Figure 7.** Dégradation de la cellulose colloïdale. C2 Hammam Bouhnifia/Mascara (source d'eau gazeuse) (Khelil et Cheba, 2014)

D'après Elkazzaz *et al.* (2020), un total de 24 isolats a été testé à partir d'une source thermale (Égypte), la majorité des isolats ont été montrés une activité de cellulase, donc les résultats précédents montrent que les différences dans le nombre d'isolats ont été réussies de chaque point d'isolation peuvent être influencées par des conditions environnementales favorables à la vie bactérienne, ces conditions environnementales comprennent des facteurs biotiques et abiotiques, y compris la présence des feuilles sèches, d'herbe et de mousse, ainsi que la température et le pH (Pitri *et al.*, 2015).

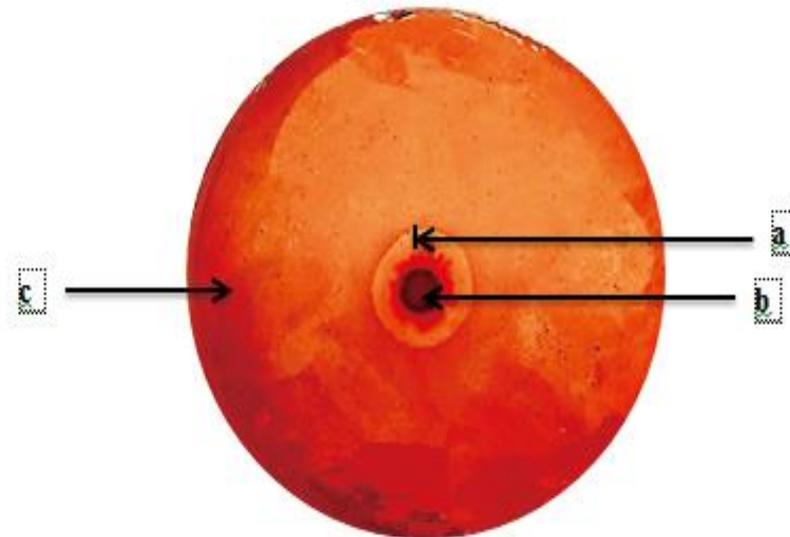
### 4.2. Détection d'enzyme extracellulaire

Le processus de sélection des bactéries cellulolytiques par le test au rouge Congo étant donné que la seule source de carbone dans la gélose est la CMC, les résultats du test démontrent fortement que la cellulase est produite pour dégrader la cellulose. (Baharuddin *et al.*, 2010). La Figure 2 montre une souche *Sulfolobus solfataricus* MT4 cultivée sur extrait de levure avec des acides aminés et 0,2 % de carboxyméthylcellulose (CMC), Il a été conclu que lors de l'ajout de CMC, un halo clair d'hydrolyse de la CMC formée autour de la zone de croissance des cellules après coloration au rouge Congo, ce qui indique une activité cellulase dans les cellules MT4 (Limauro *et al.*, 2001).



**Figure 8.**Détection de l'activité cellulase de l'hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* MT4 (Limauro *et al.*, 2001).

La zone claire de l'isolat a été mesurée sur la base de l'indice cellulolytique L'IC. L'indice cellulolytique a été calculée en mesurant le rapport entre le diamètre de la zone claire par rapport au diamètre de la colonie (Figure 3) (Hossain *et al.*, 2021).

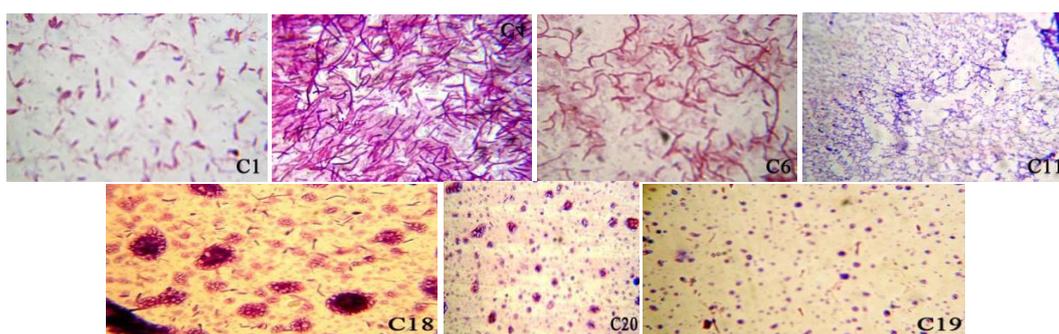


**Figure 9.** Criblage d'isolats de bactéries thermophiles productrices de cellulase, (a) zone claire, (b) colonie bactérienne, et (c) milieu CMC inondé avec 1% de rouge de congo (Khalila *et al.*, 2020).

### 4.3. Identification microscopique et biochimique

Seize souches cellulolytiques ont été observées en microscope optique, dont les bactéries à Gram positif étaient prédominantes (10 bactéries de famille *Bacillaceae* sont isolées), avec 3 levures cellulolytiques qui peuvent se développer à 60°C.

La Figure 4 montre certaines diversités microbiennes cellulolytique des thermophiles producteurs de cellulase (Khelil et Cheba, 2014). Une autre étude montre que la température de *Bacillus* sp. a dépassé 60 °C et atteint jusqu'à 70 °C (Khalila *et al.*, 2020).



**Figure 10.** Observation microscopique des microorganismes cellulolytiques isolées. C1 *Bacillus* (Gram-variable) avec une disposition comme une lettre chinoise. C4 Bactérie de grande taille à Gram positif. C6 *Bacillus* (Gram-variable). C11 Cocci encapsulé à Gram-positif. C18, C19 et C20 levures cellulolytiques thermophiles (X1800) (Khelil et Cheba, 2014).

Le tableau 1 montre quelques caractères morphologiques et biochimiques des isolats à partir de différentes sources thermales en Indonésie (Khalila *et al.*, 2020).

**Tableau 3.** Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens thermophiles producteurs de cellulase.

Caractères	<i>Bacillus sp.1</i> (T 70 °C)	<i>Bacillus sp.2</i> (T 60 °C)
Gram	+	+
Forme	-	-
Catalase	-	-
Citrate de Simmons	-	-
Indole	-	-
Mobilité	+	+
Rouge de méthyle	-	-
Voges Proskauer	-	-
TSIA (B/S)	Y/Y	Y/Y

+ : Réaction positif, - : réaction négative, Y= jaune, T=Température.

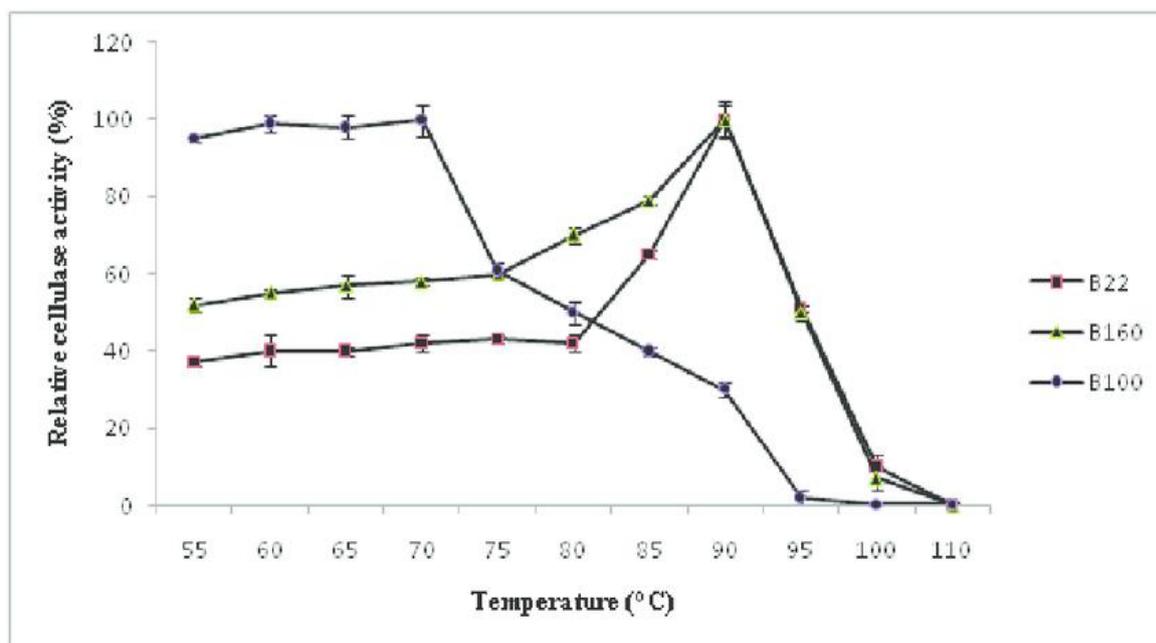
Une autre étude réalisée par Acharya et Chaudhary (2011) à partir d'une autre source thermale (Inde) et après identification des isolats par analyses ADNr 16S, ils sont trouvés *B.Lichéniformes* WBS1 et *bacillus sp.* WBS3 avec une haute activité CMC<sub>Case</sub> (1.118 IU/ml et 0.088 IU/ml) à 60 °C donc les résultats précédentes montrent qu'il existe une grande étude qui base sur la production d'enzymes cellulase thermostable à partir de la bactérie à Gram positif (Khelil et cheba, 2014).

#### 4.4.Effet de différents paramètres sur la production de cellulases

##### A. Effet de la température

Les profils de température ont été déterminés par dosage d'activité de cellulase à une température comprise entre 55 et 110°C. Pour chaque souche, l'activité la plus élevée a été considérée comme 100 %. La cellulase de B100 a montré un comportement presque identique à celui de *Geobacillus sp.*T1 (Assareh *et al.*, 2012).

En effet, tous deux avaient une activité optimale à 70°C et maintenaient leurs activités à 90°C. Cellulases des souches B22 et B160 avait une activité optimale à 90°C (161.15U/mg et 138,8U/mg respectivement) (Figure 5) (wajdi, 2016).



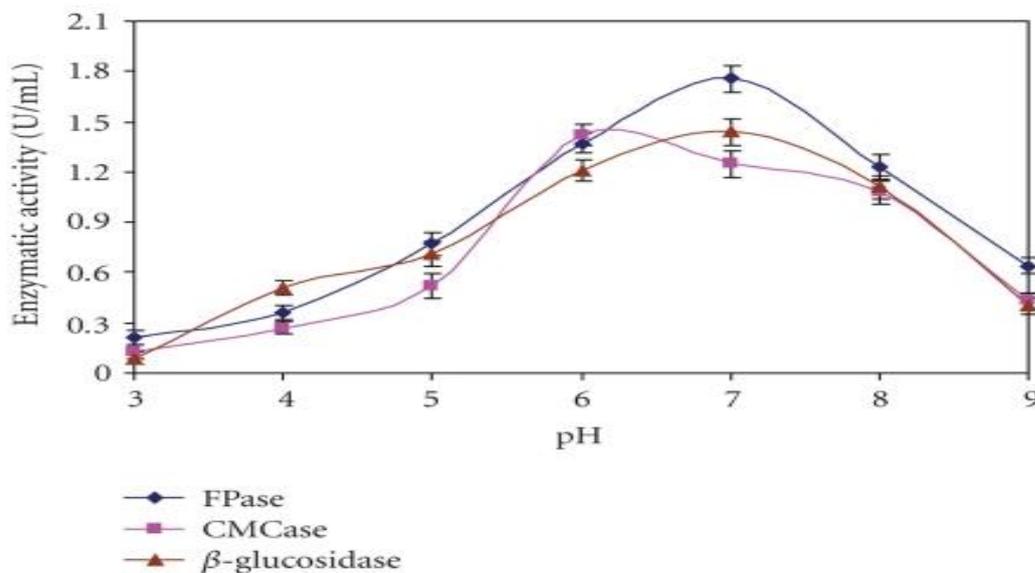
**Figure 11.** Effet de la température sur l'activité cellulase (Wajdi, 2016)

### B. Effet du pH

Il existe une forte influence du pH initial du milieu sur la production enzymatique. Pour évaluer les effets de la valeur du pH dans un substrat sur la synthèse de la cellulase, les valeurs du pH ont été ajustées par l'ajout de HCl ou de NaOH à 3,0, 4,0, 5,0, 7,0, 8,0 et 9,0. Les résultats présentés dans la figure 6 montrent que la production d'exoglucanase (1,76 et 2,16 U/mL), d'endoglucanase (1,25 et 1,94 U/mL) et de  $\beta$ -glucosidase (1,44 et 1,71 U/mL) par *A. niger* et *Trichoderma sp.* a été trouvée entre 6-7 et 5-6 pH. Les pH optimaux pour l'activité cellulase ont été trouvés à pH 6,5.

L'activité enzymatique augmentait progressivement lors de l'augmentation du pH jusqu'à l'optimum suivi d'une pleine activité progressive. Il a également été noté que l'activité enzymatique était stable à un pH compris entre 5,0 et 8,0.

L'effet du pH sur la production de cellulase par ces champignons corrobore les conclusions de Pretorius (2002) qui ont rapporté que les activités CMCase, Avicase et FPase présentait un pH optimal d'environ 4, tandis que le pH optimal de la  $\beta$ -glucosidase se situait entre pH 5-6.



**Figure 12.** Effet de pH sur la production de cellulase (Wajdi, 2016)

### C. Effet des sources de carbone

Les sources de carbone jouent un rôle important dans le métabolisme cellulaire et la synthèse de la cellulase. L'effet des sources de carbone sur la production d'enzymes par *A. niger* et *Trichoderma sp.* a été testée par Le glucose, le saccharose, la cellulose, la carboxyméthylcellulose et le maltose (de 0,5 à 3,0 % p/v) comme sources de carbone. (Solomon, 1997)

La cellulose et le CMC ont été avérés être les meilleures sources de carbone pour la production d'enzymes Par *A. Niger*. Cependant, la production maximale d'exoglucanase (1,97 U/ml), d'endoglucanase (1,67 U/ml) et de β-glucosidase (2,31 U/ml) a été obtenue dans des cultures contenant 1,0 % de cellulose. Parmi les diverses sources de carbone utilisées, la CMC était la deuxième meilleure source de carbone (1,0 %) pour la production de cellulase par *A. niger*, suivie du saccharose, du glucose et du maltose alors que par la *Trichoderma sp.* c'est le Saccharose de (1,0%) puis glucose, maltose de cellulose, CMC (Sherief, 2010 ; Solomon, 1997).

### D. Effet des sources d'azote

L'effet de différentes sources d'azote sur la production de l'enzyme cellulase par *A. niger* et *Trichoderma sp.* a été étudié. Les sources d'azote testées ont été allaient de 0,5 à 3,0 % (p/v) de peptone, d'extrait de bœuf, d'extrait de levure, de nitrate d'ammonium et de nitrate de sodium.

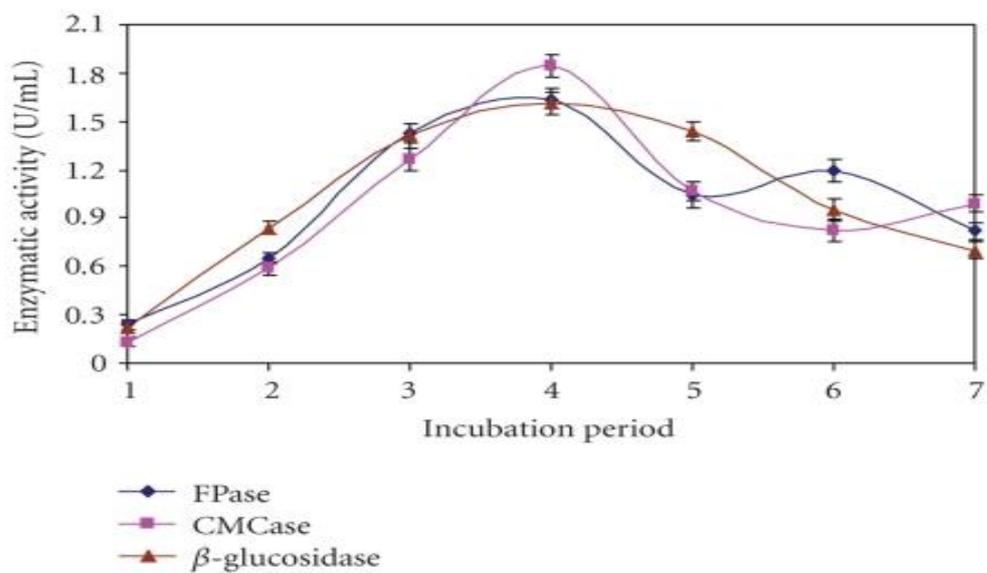
Parmi les différentes sources d'azote, la production de cellulase la plus élevée (exoglucanase (1,78 U/mL), endoglucanase (1,44 U/mL) et  $\beta$ -glucosidase (1,97 U/mL)) a été signalée à partir de 1,0 % de peptone et la production a diminué de manière significative en dessous et au-dessus de cette valeur. La peptone a produit un maximum de cellulase, suivie du nitrate d'ammonium et de l'extrait de bœuf, tandis que l'extrait de levure et le nitrate de sodium ont produit presque la même quantité, moindre, de cellulase par *A. niger*, bien que les sources d'azote aient eu un effet marqué sur l'enzyme produite par *Trichoderma* sp. Les activités enzymatiques maximales ont été obtenues avec l'extrait de levure (1,0 %) qui a entraîné une amélioration de tous les trois composants de la cellulase, y compris l'exoglucanase (2,40 U/mL), l'endoglucanase (2,28 U/mL) et la  $\beta$ -glucosidase (1,99 U/mL), où la peptone produit également la deuxième source d'azote la plus productrice de cellulase par *Trichoderma* sp. (Reczey, 1996)

Il a été rapporté qu'un bon rendement en cellulase peut être obtenu avec un composé d'ammonium comme source d'azote. Bien que l'ajout de sources d'azote organique telles que l'extrait de bœuf et la peptone ait entraîné une augmentation de la croissance et de la production d'enzymes, comme cela a été signalé précédemment, ils ne remplaçaient pas efficacement les sources d'azote inorganique en raison de leur coût plus élevé (Tao, 1999).

### **E. Effet de la période d'incubation**

*Aspergillus niger* a été inoculé dans une fiole Erlenmeyer de 150 ml de solution saline et incubé à  $45 \pm 2$  °C pendant une période de 7 jours. L'activité cellulase a été mesurée régulièrement. Cependant, le rendement maximum d'activité exoglucanase (1,64 U/mL) et endoglucanase (1,84 U/mL) a été obtenu après 4 jours. Cependant, l'activité  $\beta$ -glucosidase maximale (1,61 U/mL) a été montrée sur la Figure 7 après une incubation de 3 et 5 jours. Pour déterminer le temps d'incubation optimal pour la production d'enzymes par *Trichoderma* sp., la plus grande quantité de glucose a été mesurée le 5ème jour. La période d'incubation est dans une certaine mesure, directement liée à la production d'enzymes et d'autres processus métaboliques.

Les périodes d'incubation pour atteindre l'activité cellulase maximale par l'isolat *A. niger* et *Trichoderma* sp étaient les 4e et 6e jours. Cela pourrait être dû à l'épuisement des nutriments dans le milieu qui a stressé la physiologie fongique entraînant l'inactivation de la machinerie de secrétariat des enzymes (Nochur, 1993).



**Figure 13.** Effet de la période d'incubation sur l'activité de cellulase (Wajdi, 2016)

# **Conclusion**

## Conclusion

Les efforts ont été faits dans ce travail pour l'étude, l'isolement, l'identification des microorganismes hyperthermophiles producteurs de cellulase et les effets de quelques paramètres sur la production de cellulase à partir de différentes sources thermales.

Au total, 18 isolats ont été étudiés, parmi lesquels y avait deux hyperthermophiles *Sulfolobus solfataricus* et *pyrococcus horikoshii*. La caractérisation morphologique et physiologique des isolats a été effectuée.

Pour révéler l'activité cellulosique des microorganismes, le diamètre de la zone claire autour de la colonie sur gélose au rouge Congo ont été mesurés. Le rouge-congo permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase.

L'activité cellulosique des isolats a été étudiée et il a été constaté qu'après 4 à 6 jours d'incubation dans un milieu CMC spécifique des hyperthermophiles et un composé d'ammonium à 80 °C à pH 7, les deux isolats ont donné une activité optimale.

# **Les références bibliographiques**

## Les références bibliographiques

1. Abdel-Azeem, A. M., Yadav, A. N., Yadav, N., & Sharma, M. (2021). Industrially important fungi for sustainable development: Volume 2: Bioprospecting for biomolecules. Springer International Publishing AG.
2. Acharya, S., & Chaudhary, A. (2011). Effect of nutritional and environmental factors on cellulases activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. *Journal of Scientific & Industrial Research (New Delhi, India : 1963)*, 70(2), 142-148.
3. Adams, P. D. Pereira, J. H., Chen, Z., McAndrew, R. P., Sapra, R., Chhabra, S. R. & Sale, K. L., ...(2010). Biochemical characterization and crystal structure of endoglucanase Cel5A from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*. *Journal of structural biology*, 172(3), 372-379.
4. Ahn, DJ, Kim, SK, et Yun, HS (2012). Optimisation du prétraitement et de la saccharification pour la production de bioéthanol à partir de jacinthe d'eau par *Saccharomyces cerevisiae*. *Génie des bioprocédés et des biosystèmes*, 35 (1), 35-41.
5. Ajeje, S. B., Hu, Y., Song, G., Peter, S. B., Afful, R. G., Sun, F., ... & Sun, H. (2021). Thermostable cellulases/xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: current perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
6. Alain, K., Barbier, G., Hamdi, M., & Prieur, D. (2010). Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles*, 14(6), 501-514.
7. Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002). Hyperthermostable
8. Argyrios, Rosemina FJ Merchant, and Makoto Yaguchi. "Thermostable cellulases from thermophilic microorganisms." *Critical Reviews in Biotechnology* 4.3 (1986): 327-367.
9. Aufrere, J., & Michalet-doreau, B. (1990). Nouvelles méthodes d'estimation de la valeur alimentaire des fourrages. II: Méthodes enzymatiques. *Fourrages (Versailles)*, (122), 203-217.
10. Baharuddin, A. S., Razak, M. N. A., Hock, L. S., Ahmad, M. N., Abd-Aziz, S., Rahman, N. A. A., Shah, U. K. M., Hassan, M. A., Sakai, K., & Shirai, Y. (2010). Isolation and characterization of thermophilic cellulase-producing bacteria from empty fruit bunches-palm oil mill effluent compost. *American Journal of Applied Sciences*, 7(1), 56-62
11. Bensmira, S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulases thermostables à intérêt industriel. Doctoral dissertation, Université Mentouri, Constantine.

12. Bisaria, V.S., Ghose, S.N. (1960). Biodegradation of cellulosic materials, Substrates Microorganisms, enzymes and production enzymes, *Microb. Technol.* 3, p:90-104.
13. Boukari, I. (2010). Définition des critères d'efficacité d'une hémicellulase pour l'hydrolyse de substrats lignocellulosiques complexes et insolubles (Doctoral dissertation, Université de Reims Champagne Ardenne).
14. Bustard, M. T., Burgess, J. G., Meeyoo, V., & Wright, P. C. (2000). Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries.
15. Byrne, S., Guillard, A., & Barth, S. (2008). Segregation distortion in *Lolium*: evidence for genetic effects. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(2), 297-306.
16. Cheba A , B. (2020). Chitosan: properties, modifications and food nanobiotechnology. *Procedia Manufacturing*, 46, 652-658.
17. Cornec, L., Loaec, M., Rougeaux, H., Guezennec, J., & Dietrich, J. (1997). Molécules d'intérêt biotechnologique issues des micro-organismes hydrothermaux: enzymes thermostables et polysaccharides.
18. Cui, Z. J., Ishii, M., Kato, S., Haruta, S. & Igarashi, Y. (2005). Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7099-7106.
19. Desvaux, M., Guedon, E., & Petitdemange, H. (2001). Metabolic flux in cellulose batch and cellulose-fed continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* in response to acidic environment. *Microbiology*, 147(6), 1461-1471.
20. Deswal, D., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource technology*, 102(10), 6065-6072.
21. Djaafri, M. (2020). Amélioration de la digestion anaérobie des déchets
22. Elkazza ,W .,Elsharayidi,M. ,Deweder ,A. ,& Chaudhary,A&Shafik, H .(2020). Screening for hydrolytic enzyme production by thermophilic microbes isolated from Egyptian hot spring. *Journal of plant production sciences* , 9(1), 17-22
23. Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1) p:430-433.
24. Fiala-Médioni, A., & Jollès, P. (1996). The ruminant digestion model using extremophilic bacteria already employed early in evolution by symbiotic molluscs. *Journal of molecular evolution*, 43(5), 523-527.

- 25.** Gao, F., Hao, Z., Sun, X., Qin, L., Zhao, T., Liu, W., ... & Su, X. (2018). A versatile system for fast screening and isolation of *Trichoderma reesei* cellulase hyperproducers based on DsRed and fluorescence-assisted cell sorting. *Biotechnology for biofuels*, *11*(1), 1-13.
- 26.** Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology research international*, 2011
- 27.** Ge, Y., Burmaa, B., Zhang, S., Wang, S., Zhou, H., & Li, W. (1997). Co-immobilization of cellulase and glucose isomerase by molecular deposition technique. *Biotechnology techniques*, *11*(5), 359-361.
- 28.** Gupta, A., & Verma, J. P (2015) Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, *41*, 550-567.
- 29.** Hebal, H., Boucherba, N., Binay, B., & Turunen, O. (2021). Activity and stability of hyperthermostable cellulases and xylanases in ionic liquids. *Biocatalysis and Biotransformation*, *39*(4), 242-259.
- 30.** Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ; vol. 63, pp. 735-750.
- 31.** Huber, D. J. O'donoghue, E. M., (2000). Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase. *Physiologia Plantarum*, *86*(1), 33-42.
- 32.** Ibrahim, A. S. S., & El-diwany, A. I. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *1*(4), 473-4783
- 33.** Isikgor FH, Becer CR (2015) Biomasse lignocellulosique : une plateforme durable pour la production de produits chimiques et de polymères biosourcés. *Poly Chem* 6:4497–4559
- 34.** Joshua, I., Ding, L., Wang, B., Feng, X., Mao, Z. & Sui, X. (2011). Rheology of regenerated cellulose suspension and influence of sodium alginate. *International journal of biological macromolecules*, *148*, 811-816.
- 35.** Kader. A. J., Omar. O., Feng. L. S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of Biodiversity and Environmental Conservation.

36. Khalila, R., Fitri, L., & SUHARTONO, S. (2020). Isolation and characterization of thermophilic bacteria as cellulolytic enzyme producer from the hot spring of ie seuum aceh besar, indonesia. *Microbiology Indonesia*, 14(1), 4.
37. Khelil, O., & Cheba, B. (2014). Thermophilic cellulolytic microorganisms from western algerian sources: Promising isolates for cellulosic biomass recycling. *Procedia Technology*, 12, 519-528.
38. Krahe, N. K., Linke, D., & Berger, R. G. (1996). BadGluc, a  $\beta$ -glucosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(9), 1391-1401.
39. Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.
40. Liu, W., Sun, Y., Sun, N., Zhang, L., & Zhong, Y. (2019). Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* via disruption of multiple protease genes identified by comparative secretomics. *Frontiers in microbiology*, 10, 2784.
41. Lossouarn, J., Podosokorskaya, O. A., Kublanov, I., & Nesbø, C. L. (2014). Habitat generalists or specialists, insights from comparative genomic analyses of *Thermosiphon* lineages. *bioRxiv*, 106989.
42. Margaritis, A., Merchant, R. F., & Yaguchi, M. (1986). Thermostable cellulases from thermophilic microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 4(3), 327-367.
43. Marouf, A., & Tremblin, G. (2021). Partie IV substances d'origine microbienne . In *Abrégé de biochimie appliquée* (pp. 299-352). EDP Sciences.
44. Maugeri-Filho, F. (2013). Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. *Bioresource technology*, 128, 797-803.
45. Nekleva, Y., Krasinko, V., & Sychin, S. (2014). Traitement du fourrage par des enzymes comportant un ensemble des cellulases pour l'amélioration de leur valeur alimentaire. *Sciencerise*, 4(1(4)), 7-10.
46. Paillet .F (2013). Les biocarburants .mémoire de master en énergie. Université de Montpellier 2.
47. Patel, A. K., Singhanian, R. R., Sim, S. J., & Pandey, A. (2019). Thermostable cellulases: current status and perspectives. *Bioresource technology*, 279, 385-392.
48. Pitri, R. E., Agustien, A., & Febria, F. A. (2015). Isolation and characterization of amylothermophilic bacteria from Medang River hot springs. *J Bio UA*, 4(2), 119-122.

- 49.** Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2013). Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass techniques, applications and commercialization. InTech*, 119-155.
- 50.** Reffas, F. Z. I. (2017). *Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase*. Doctoral dissertation, Université Djilalli de Sidi Bel Abbes, Sidi Bel Abbes.
- 51.** Reid, I. D. (s.d.). Biodegradation of lignin. (P.-C. John's Boulevard, Éd.) *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1011-1018.
- 52.** Reverbel-Leroy, C., Parsiegla, G., Moreau, V., Juy, M., Tardif, C., Driguez, H., Bélaich, J. P., & Haser, R. (1998). Crystallization of the catalytic domain of clostridium cellulolyticum CeLF cellulase in the presence of a newly synthesized cellulase inhibitor. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography.*, 54(Pt 1), 114-118.
- 53.** Rigotti, D., Pegoretti, A., & Miotello, A. (2020). Chloroform desorption from poly (lactic acid) nanocomposites: a thermal desorption spectroscopy study. *Pure and Applied Chemistry*, 92(3), 391-398.
- 54.** Sassen M.M.A (1993) .De celwand natur & techniek 61 :896-903
- 55.** Schamburg. D., Salzmann. M.G.B.F.(1991). Cellulase. P: 1-11. In:Enzyme HandBook.Volume IV Springer- Verlag Berlin
- 56.** Schulein .M. (1988). *Methods Enzymol*, 160, p: 234-242.
- 57.** Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*, 2013
- 58.** Sharp, A. H., Wagster, M. V., Becher, M., Schilling, G., Ross, C. A., ... & Dawson, T. M. (1996). Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 5037-5042.
- 59.** Spotti, M. J., & Campanella, O. H. (2020). Enzymatic processes of dietary fibers. In *Science and Technology of Fibers in Food Systems* (pp. 301-327). Springer, Cham.
- 60.** Sreeja, S. J., Jeba, M. P. W., Sharmila, J. F. R., Steffi, T., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2013). Optimization of cellulase production by *Bacillus altitudinis* APS MSU and *Bacillus licheniformis* APS2 MSU, gut isolates of fish *Etroplus suratensis*. *Int J Adva Res & Technol*, 2(4), 401-6
- 61.** Stetter, K. O. & Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A. T., Robb, F. T. (2010). *Extremophiles handbook*. Springer Science & Business Media.

- 62.** Stryer. L., Berg. J. M., Tymoczko. J. L. (2003). Biochimie. 5<sup>ème</sup> édition Médecine-Sciences.Flammariion. Paris. P: 303
- 63.** Sukumaran, R.K., Singhanian,R.R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases-Production,applications and challenges.*Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, 832-844
- 64.** Taylor, E. C. (1984). Decomposition in arid environments: role of the detritivore gut. *South African Journal of Science*, 80(4), 170.
- 65.** Uzuner, S., & Cekmecelioglu, D. (2019). Enzymes in the beverage industry. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 29-43). Academic Press.
- 66.** Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 213-218.
- 67.** Wang, J., Wang, J., Lu, Z., & Zhang, J. (2020). Adsorption and desorption of cellulase on/from enzymatic residual lignin after alkali pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 155, 112811.
- 68.** Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 259-263.
- 69.** Yang, D. J., Dong, R. J., Zheng, D. F. & Qiu, X. Q. (2019). pH-responsive lignin-based magnetic nanoparticles for recovery of cellulase. *Bioresource technology*, 294, 122133.
- 70.** Zhang, X. Z., & Zhang, Y. H. P. (2013). Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*, 1, 131-146.
- 71.** Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), 452-481.

# **Annexes**

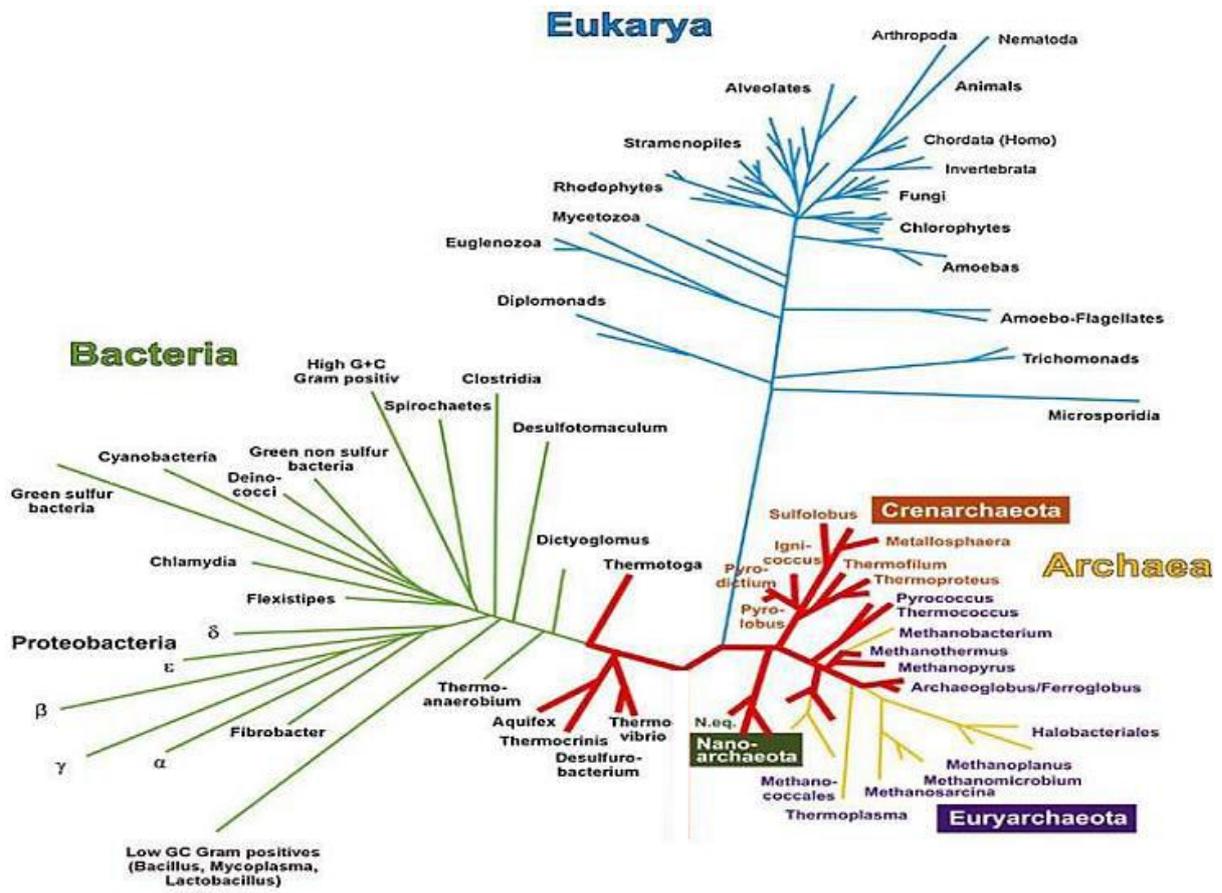
## Annexes

### Annexe (1)

#### Liste des articles analysés

1. Djaafri, M. (2020). Amélioration de la digestion anaérobie des déchets endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1) p:430-433.
2. Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology research international*, 2011
3. Ibrahim, A. S. S., & El-diwany, A. I. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4), 473-4783
4. Margaritis, A., Merchant, R. F., & Yaguchi, M. (1986). Thermostable cellulases from thermophilic microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 4(3), 327-367.
5. Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*, 2013
6. Zhang, X. Z., & Zhang, Y. H. P. (2013). Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers, 1*, 131-146.
7. Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), 452-481.
8. Lossouarn, J., Podosokorskaya, O. A., Kublanov, I., & Nesbø, C. L. (2014). Habitat generalists or specialists, insights from comparative genomic analyses of *Thermosiphon* lineages. *bioRxiv*, 106989.
9. Margaritis, A., Merchant, R. F., & Yaguchi, M. (1986). Thermostable cellulases from thermophilic microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 4(3), 327-367.
10. Liu, W., Sun, Y., Sun, N., Zhang, L., & Zhong, Y. (2019). Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* via disruption of multiple protease genes identified by comparative secretomics. *Frontiers in microbiology*, 10, 2784

Annexe(2)



**Figure 8.** Arbre phylogénique du vivant d'après Alain modifié par Stetter (2006) (Les hyperthermophiles sont représentés en traits rouges) (Byrne, 2008).

## المخلص

الهدف من هذا العمل هو عزل ووصف بعض الكائنات الحية الدقيقة شديدة الحرارة القادرة على إنتاج السليلوز المعزولة من بيئات مختلفة. ولأن فرط الحرارة ينتمون إلى المحبات الحرارية فإن النتائج التي تم الحصول عليها تشمل النوعين ومن بينها *Sulfolobus solfataricus* و *Pyrococcus horikoshii* كانت الظروف المثلى التي تم العثور عليها لإنتاج السليلوز حوالي 80 درجة مئوية وعند درجة الحموضة 7، والسليولوز و CMC كأفضل مصادر للكربون و مركب الأمونيوم كأفضل مصدر للأزوت. الإنتاج العالي للسليولوز نتحصل عليها عن طريق CMC في التركيز 1 % لمدة 4 إلى 6 أيام من الحرارة .  
يكون الاختلاف في درجة الحموضة والحرارة المثلى بسبب الاختلاف بين انواع سلالة المنتج.  
الكلمات المفتاحية : السليلوز ، فرط الحرارة ، المحبات للحرارة ، الحرارة.

## Résumé

L'objectif de ce travail est d'isoler et caractériser quelques microorganismes hyperthermophiles capable de produire la cellulase qui ont été isolées de différents environnements. et parce que les hyperthermophiles appartiennent au thermophiles les résultats qui ont été obtenus comprennent les deux types et parmi lesquels le genre d'archées *Sulfolobus* notamment *Sulfolobus solfataricus* et un pyrocoque qui est le *P.horikoshii* qui sont considérés parmi les hyperthermophiles producteurs de cellulase les plus étudiés

les conditions optimales trouvées pour la production de cellulase étaient d'environ 80 °C à et à pH 7, la cellulose et le CMC comme meilleure sources de carbone et un composé d'ammonium comme meilleur source d'azote. Une production élevée de cellulase est obtenue sur (CMC) à la concentration 1% pendant quatre à six jours d'incubation . La variation du pH et de la température optimales pour l'activité de la cellulase peut être due à la différence entre les types de souches du producteur.

**Mots clés :** Cellulase, hyperthermophiles, thermophiles, température.

## Abstract

The objective of this work is to isolate and characterize some hyperthermophilic microorganisms capable of producing cellulase which have been isolated from different environments. and because the hyperthermophiles belong to the thermophiles the results which have been obtained include the two types and among which the genus of archaea *Sulfolobus* in particular *Sulfolobus solfataricus* and a pyrococci which is the *P. horikoshii* which are considered among the most cellulase-producing hyperthermophiles studied

the optimum conditions found for cellulase production were around 80°C at and at pH 7, cellulose and CMC as the best carbon sources and an ammonium compound as the best nitrogen source. High cellulase production is obtained on (CMC) at 1% concentration for four to six days of incubation. The variation in optimum pH and temperature for cellulase activity may be due to the difference between the strain types of the producer.

**Key words :** Cellulase , hyperthermophilics , thermophilics, temperature.